

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CURITIBANOS
BRUNA ORSI

**USO DE LINHAGENS QUASE ISOGÊNICAS DE TOMATEIRO COMO
FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO PAPEL DOS CAROTENÓIDES NA
SUSCETIBILIDADE DOS FRUTOS AO FUNGO *Botrytis cinerea***

Curitibanos
2016

BRUNA ORSI

**USO DE LINHAGENS QUASE ISOGÊNICAS DE TOMATEIRO COMO
FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO PAPEL DOS CAROTENÓIDES NA
SUSCETIBILIDADE DOS FRUTOS AO FUNGO *Botrytis cinerea***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Agronomia, da Universidade Federal de Santa Catarina/ Centro Curitibanos como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Sestari.

Curitibanos
2016

Orsi, Bruna

Uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro como ferramenta para o estudo do papel dos carotenóides na suscetibilidade dos frutos ao fungo *Botrytis cinerea* / Bruna Orsi ; orientador, Ivan Sestari - Curitiba, SC, 2016.
30 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitiba. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Micro-Tom. 3. Carotenóides. 4. Mofo cinzento. I. Sestari, Ivan. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CURITIBANOS
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulisses Gaboardi, km3 – Zona Rural – CEP: 89520-000 – Curitibanos/SC
CEP 89520-000 – Curitibanos – SC
TELEFONE: (48) 3721 -4168 Email: agronomia.cbs@contato.ufsc.br

Bruna Orsi

**USO DE LINHAGENS QUASE ISOGÊNICAS DE TOMATEIRO COMO
FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO PAPEL DOS CAROTENIDES NA
SUSCETIBILIDADE DOS FRUTOS AO FUNGO *Botrytis cinerea***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheira Agrônoma, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 11 de julho de 2016.

Prof. Dr. Samuel Luiz Fioreze
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ivan Sestari
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa.Dra. Ana Carolina Lara Fioreze
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Samuel Fioreze
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos mutantes utilizados no experimento.	11
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Via biossintética de carotenóides. Em azul, as enzimas participantes do ciclo e em verde, as mutações nas atividades enzimáticas das NILs utilizadas neste trabalho. Adaptado de Bordignon (2015).15
- Figura 2.** Quantidade de frutos descartados durante os dias de avaliação. Barras verticais indicam o erro padrão (n=6).16
- Figura 3.** Suscetibilidade de genótipos de tomateiro ao fungo *B. cinerea*. Caracterização visual dos sintomas em lesões em 2, 3 e 4 dias após a inoculação (DAI) com *B. cinerea*.17
- Figura 4.** Suscetibilidade de NIL de tomateiro ao fungo *B. cinerea* após quatro dias de inoculação. (A) Incidência da doença (B) Severidade da doença. Índice de severidade (número de lesões com sintoma): 0= nenhuma lesão; 1= uma lesão; 2= duas lesões; 3= três lesões e 4= quatro lesões. (C) Evolução do diâmetro das lesões. Barras verticais indicam o erro padrão (n=6). (*) Diferença significativa entre os genótipos dada pelo teste de Tukey ($p<0,05$).21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1.	CULTURA DE <i>Botrytis cinerea</i> E INOCULAÇÃO DOS FRUTOS	12
2.2.	SUSCETIBILIDADE DOS FRUTOS	13
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4	CONCLUSÕES	24
	Abstract.....	25
	REFERÊNCIAS	26

Uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro como ferramenta para o estudo do papel dos carotenóides na suscetibilidade dos frutos ao fungo *Botrytis cinerea*

Bruna Orsi

Resumo

O fungo *Botrytis cinerea* é responsável por considerável volume de perdas no período pós-colheita de muitas espécies de frutos. Para avaliar a contribuição dos carotenóides na suscetibilidade de frutos às podridões ocasionadas por este fungo foram utilizadas cinco linhagens quase isogênicas (NIL) à cultivar Micro Tom, diferenciando apenas quanto ao tipo predominante de carotenóide acumulado nos frutos, sendo elas: *tangerine*, *Delta carotene*, *Beta carotene*, *yellow flesh* e *colorless fruit epidermis*. Os frutos de cada genótipo foram lesionados e inoculados com o fungo *Botrytis cinerea* (10^5 esporos mL⁻¹) e a suscetibilidade representada pela incidência, severidade e diâmetro de lesão. Os resultados indicaram elevada suscetibilidade para a maioria dos genótipos com exceção do mutante *Delta carotene*, que se mostrou menos suscetível ao fungo mesmo em avançado estágio de maturação. O mutante *colorless fruit epidermis* se mostrou mais suscetível, possivelmente em função da ausência de flavonoides na casca dos frutos. O acentuado amolecimento e escurecimento dos tecidos das lesões observado em *tangerine*, *yellow flesh* e *Beta carotene*, contribuiu para o aumento da suscetibilidade, entretanto visualmente o crescimento micelial do fungo foi suprimido nestes genótipos. Acredita-se que o avançado estágio de maturação dos frutos no momento da inoculação contribuiu para o aumento da suscetibilidade ao fungo em todos os genótipos, por essa razão, novos estudos são necessários para elucidar a real contribuição dos carotenóides na suscetibilidade dos frutos ao mofo cinzento.

PALAVRAS-CHAVE: Micro-Tom. Carotenóides. Mofo cinzento.

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*), originário da América do Sul, é uma das hortaliças de maior importância econômica no Brasil, ao lado da batata e cebola. No ano de 2015 o valor bruto da produção do tomate foi o maior dentre as hortaliças de importância econômica no cenário nacional (MAPA, 2015). Existem diversos usos aplicados a esse fruto, seja na forma processada pela indústria, onde o tomate é matéria prima para produção de molhos prontos, conservas e extratos, bem como no consumo *in natura* (WELLS, 2016). O tomate é fonte de carotenóides, o que lhe confere as propriedades nutracêuticas apreciada pelos consumidores. O fruto apresenta altos teores de licopeno, bem como beta caroteno, zeaxatina e luteína, estes dois últimos em menores concentrações (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Dentre as maiores causas de perdas na pós-colheita do tomate estão os patógenos *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium spp.* e *Botrytis cinerea* que causam degradação dos frutos (ZHAO et al., 2008). O fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* pode infectar flores, frutos, folhas e caules. As principais medidas de controle deste fungo são realizadas antes da colheita, considerando a falta de métodos eficientes no período de armazenamento dos frutos (DROBY; LICHTER, 2004). O mecanismo de infecção deste patógeno envolve a indução da resposta de hipersensibilidade nos hospedeiros, tomando vantagem deste mecanismo de resistência que forma tecidos necróticos (ROSSI et al., 2011).

Os vegetais superiores possuem mecanismos naturais de defesa a patógenos que incluem a produção de metabólitos secundários como terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os carotenóides, incluídos na classe dos terpenos, são moléculas derivadas de isoprenóides e são compostos por oito unidades de isoprenos (C₅) (RUIZ-SOLA; RODRIGUES-CONCEPCIÓN, 2012). São pigmentos lipossolúveis que conferem a coloração de frutos, folhas e flores, bem como o aroma característico de algumas espécies. Na fotossíntese os carotenóides desempenham a função de antenas auxiliares, absorvendo luz em regiões do espectro visível que a clorofila não absorve, além de atuarem como fotoprotetores do sistema fotossintético, evitando a formação de oxigênio singlete no processo conhecido por *quenching* não fotoquímico. Outra função importante dos carotenóides está relacionada às suas propriedades antioxidantes, promovendo o sequestro de radicais livres e desativando espécies reativas de oxigênio (EROs),

evitando o estresse oxidativo. Embora sejam considerados metabólitos secundários, os carotenóides também são precursores de fito hormônios envolvidos diretamente no crescimento e desenvolvimento vegetal, como o ácido abscísico (ABA) e as estrigolactonas (CAZZONELLI, 2011).

A biossíntese dos carotenóides ocorre através da condensação de duas moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGPP) por ação da enzima fitoeno sintase (PSY), levando à formação de fitoeno, o primeiro carotenóide incolor (Figura 1) (JEZ; NOEL, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013). O fitoeno, através de reações de desidrogenação, ciclização e oxidação leva a formação de uma variedade de pigmentos como o β -Caroteno, δ -Caroteno e o licopeno. A variedade de cores encontradas nos vegetais varia em função do acúmulo de diferentes carotenóides. Os vegetais de coloração laranja como cenoura e abóbora apresentam grande quantidade de β -caroteno (BARBOSA-FILHO et al., 2008), enquanto vegetais com coloração verde amarelada apresenta maiores quantidades de luteína e zeaxantina. A coloração vermelha em alguns frutos se deve ao acúmulo de licopeno, principal carotenóide encontrado no tomate, melancia e goiaba (HEBER; BOWERMAN, 2001).

Em função da reconhecida atividade antioxidante destes compostos, os diferentes pigmentos acumulados podem conferir aos frutos, além da diferente coloração, um potencial antioxidante diferenciado, conforme verificado por Sun et al. (2007) ao estudarem a composição e a capacidade antioxidante de diferentes pigmentos em pimentas. Embora alguns estudos relatem a contribuição dos flavonóides na resistência do tomateiro às podridões (ZHANG et al., 2013), estudos demonstrando a real contribuição de outros tipos de pigmentos neste processo ainda são inexistentes. Estudos desta natureza poderiam ser valiosos em responder se a presença de um específico carotenóide exerce influencia direta sob a suscetibilidade de um fruto a um determinado tipo de patógeno. Para endereçar esta questão seria interessante reunir em um único modelo de estudo características como o acúmulo de um específico carotenóides no fruto e a suscetibilidade deste a um dado patógeno (biotrófico e/ou necrotróficos).

O uso de genótipos contrastantes, sejam eles mutantes ou plantas transgênicas, na atualidade representa a principal abordagem utilizada em estudos genético-fisiológicos (CARVALHO et al., 2011; CAMPOS et al., 2010; SESTARI et al., 2014). Em se tratando de frutos, o tomateiro possui uma série de atributos que o

qualificam como o principal modelo disponível para estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em frutos carnosos (GIOVANNONI, 2004). A partir de um modelo genético pode-se criar linhagens quase isogênicas para o estudo de determinada característica, o que fornece um comparativo confiável em função de todas as linhagens compartilharem o mesmo *background* genético (CARVALHO et al., 2011). Um exemplo de modelo genético que vem sendo utilizado é a cultivar Micro-Tom (MT) de tomateiro (MEISSNER et al., 1997). Trata-se de uma cultivar miniatura, de fácil cultivo em casa de vegetação e que por seu pequeno porte admite o plantio em grandes densidades, além de possuir um ciclo curto, permitindo obter em pouco tempo linhagens quase isogênicas (NIL) através da introgressão de mutações monogênicas (CAMPOS et al., 2010). Uma vez que há disponibilidade de uma coleção de NIL carregando mutações monogênicas para específicos tipos de carotenóides, na cv. MT torna-se interessante a utilização desta ferramenta para estudar o papel dos carotenóides na suscetibilidade de frutos às podridões que se desenvolvem após a colheita.

Dentre as mutações conhecidas envolvendo a composição de carotenóides, as de maior interesse para este estudo são as mutações *Delta carotene* (RONEN et al., 1999), em que o alelo dominante *Del* converte o licopeno em δ -caroteno; a mutação *tangerine* (ISAACSON et al., 2002) onde os frutos acumulam ζ -caroteno e prolicopeno; a mutação *colorless fruit epidermis* (ADATO et al., 2009) contendo o alelo *y* que causa uma diminuição no acúmulo de flavonóides na epiderme dos frutos, a mutação *Beta carotene* que confere baixo acúmulo de licopeno e alto acúmulo de β -caroteno aos frutos (ZHANG; STOMMEL JR, 2000) e a mutação *yellow flesh* (CHENG et al., 2009) cujos frutos apresentam prevalência do flavonóide rutina (Tabela 1).

Considerando a disponibilidade de NIL contendo estas mutações introgridas no mesmo *background* genético (a cv. MT) torna-se possível um estudo prospectivo de modo a verificar a contribuição de específicos pigmentos na defesa vegetal contra patógenos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi criar um modelo de estudo utilizando linhagens mutantes quase isogênicas para determinar o envolvimento dos carotenóides na suscetibilidade de frutos de tomate ao fungo *Botrytis cinerea*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades de pesquisa relacionadas ao projeto foram desenvolvidas na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Curitibanos. O cultivo dos genótipos de tomateiro para obtenção de frutos foi realizado em uma casa de vegetação com controle de temperatura (média de 28°C). A irrigação das plantas foi realizada de forma manual de acordo com a necessidade das plantas. Os genótipos utilizados neste trabalho foram a cultivar Micro-Tom (MT) e os mutantes *Beta carotene* (B), *Delta carotene* (Del), *tangerine* (t), *yellow flesh* (r) e *colorless fruit epidermis* (y) obtidos da coleção de mutantes do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (HCPD-LAB) da ESALQ-USP (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos mutantes utilizados no experimento.

Genótipo	Função gênica	Fenótipo	Referência
<i>Beta Carotene</i> (B)	Aumento da atividade da enzima licopeno β -ciclase.	Frutos de coloração laranja com altos níveis de β -caroteno.	ZHANG; STOMMEL JR, 2000
<i>yellow flesh</i> (r)	Perda de função da enzima fitoeno sintase.	Frutos de coloração amarela com prevalência do flavonóide rutina na casca.	CHENG et al., 2009
<i>tangerine</i> (t)	Perda de função da enzima carotenóide isomerase.	Acúmulo de ζ -caroteno e tetra- <i>cis</i> -licopeno. Frutos de coloração laranja.	ISAACSON et al., 2002
<i>colorless fruit epiderms</i> (y)	Aumento da atividade do fator de descrição <i>SIMYB12</i> .	Frutos de coloração rosa devido ao baixo acúmulo de flavonoides na epiderme.	ADATO et al., 2009
<i>Delta carotene</i> (Del)	Aumento da atividade da enzima licopeno ϵ -ciclase.	Altos níveis de δ -caroteno nos frutos. Coloração vermelho alaranjada.	RONEN et al., 1999

As sementes de cada genótipo foram semeadas em vasos de 350 mL contendo mistura de substrato orgânico inerte e vermiculita expandida na proporção 1:1. Após o surgimento do primeiro par de folhas verdadeiras as plântulas foram transplantadas para vasos de 5 L, contendo mistura de substrato e vermiculita na mesma proporção. De cada genótipo foram transplantadas 24 plântulas, sendo

cultivadas quatro plântulas em cada vaso, totalizando seis vasos para cada genótipo. A adubação foi feita utilizando 1g de NPK na formulação 10:10:10 L⁻¹ de substrato e 4g de calcário dolomítico (Ca + Mg) L⁻¹ de substrato. Detalhamentos adicionais a respeito dos genótipos, protocolos de cultivo e do controle fitossanitário utilizado podem ser obtidos no site <http://www.esalq.usp.br/tomato> (Protocolos > manual do modelo vegetal Micro-Tom – Cap. 1: Especificações da casa de vegetação e protocolos > manual do modelo vegetal Micro-Tom – Cap. 2: Plantio, irrigação e adubação). A colheita dos frutos foi realizada em 08 de fevereiro de 2016, com 101 dias após o transplantio (DAT). Os frutos foram colhidos no estágio de maturação característico de cada genótipo, definido pela coloração da epiderme.

2.1 CULTURA DE *Botrytis cinerea* E INOCULAÇÃO DOS FRUTOS

No mesmo dia da colheita os frutos foram inoculados com *B. cinerea*. O fungo foi isolado a partir de frutos de morangos com sintoma da doença e mantido em meio BDA (Batata dextrose ágar). Foram preparadas 20 mL de uma solução na concentração 10⁵ esporos mL⁻¹. Para isso, esporos da cultura de *B. cinerea* foram misturados em 5 mL de água ultra pura. Uma alíquota desta solução foi retirada para contagem do número de esporos em câmara de Neubauer, a fim de estimar a quantidade de água a ser adicionada à solução para obter a concentração desejada, conforme a equação a seguir.

$$C^1 \times 10.000 \times V^1 = C^2 \times V^2$$

Em que:

C¹ = Concentração inicial do número de esporos

V¹ = Quantidade inicial de água

C² = Concentração final do número de esporos

V² = Quantidade de água a ser adicionada

Após a colheita, os frutos foram selecionados quanto à ausência de manchas, injúrias mecânicas e coloração, de modo a obter-se lotes homogêneos de frutos. Após a remoção do cálice, os frutos foram desinfetados com hipoclorito de sódio 1,5% (v/v) durante cinco minutos, seguido de três lavagens em água ultra pura. A seguir foram realizadas 4 perfurações (2 mm de profundidade e 1 mm de diâmetro) equidistantes na região equatorial de cada fruto. Em cada perfuração foram

inoculados 5 µL da solução de esporos de *B. cinerea*, que foi constantemente agitada entre as inoculações. Os frutos inoculados de cada genótipo foram acondicionados em embalagens plásticas vedadas, a fim de manter as condições de assepsia. As embalagens contendo os frutos foram mantidas dentro de sala de crescimento com sistema de controle de temperatura, umidade e fotoperíodo, onde a temperatura média foi mantida em 24°C, a umidade relativa do ar próxima de 65% e 12 horas de fotoperíodo. O delineamento do experimento foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo que cada repetição foi composta por 10 frutos de cada genótipo.

2.2 SUSCETIBILIDADE DOS FRUTOS

A suscetibilidade dos frutos foi avaliada através da contagem do número de lesões desenvolvidas nos frutos e da medida do diâmetro de cada lesão. As avaliações foram realizadas no segundo, terceiro e quarto dia após a inoculação dos frutos (DAI) a fim de acompanhar a evolução dos sintomas da doença. Os dados obtidos foram representados como incidência, severidade e diâmetro médio das lesões em milímetros. A incidência representa o percentual de frutos com sintomas da doença e a severidade representa o número de lesões afetadas em cada fruto, sendo expressa como índice de 0 a 4, onde: 0= nenhuma lesão; 1= uma lesão; 2= duas lesões; 3= três lesões e 4= quatro lesões com sintoma.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% e 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultivar MT, apesar de não ser uma cultivar comercial, pode contribuir para o avanço em programas de melhoramento genético do tomateiro, uma vez que características de interesse podem ser facilmente transferidas para cultivares comerciais (SESTARI et al., 2014). A introgressão de alelos mutados em um único *background* genético representa uma poderosa ferramenta, uma vez que as variações fenotípicas encontradas nas NILs são associadas ao efeito apenas da mutação em questão (CARVALHO et al., 2010).

Neste trabalho, o uso de genótipos que compartilham a mesma base genética, diferindo apenas em relação ao tipo de pigmento acumulado nos frutos, se mostrou um adequado modelo de estudo para acessar o papel dos carotenóides na defesa vegetal, permitindo associar as respostas de menor ou maior suscetibilidade dos frutos à atividade de determinado carotenóide. As diferentes cores do epicarpo e epiderme são a principal variação fenotípica encontrada nas linhagens utilizadas neste trabalho, e são decorrentes do acúmulo predominante de carotenóides que conferem pigmentação diferenciada aos genótipos (Figura 1 e Tabela 1).

O mutante *yellow flesh* (*r*) apresenta perda de função da enzima FITOENO SINTASE 1 (PSY1), levando a formação de frutos de coloração amarelo devido ao baixo acúmulo de carotenóides, justamente por este ser um ponto crítico da via biossintética de carotenóides (Figura 1) (CHENG et al., 2009; MOISE et al., 2013). No mutante *tangerine* (*t*) os frutos adquirem coloração laranja em decorrência do acúmulo de tetra-*cis*-licopeno (prolicopeno). Esta mutação impede a expressão do gene responsável pela enzima CAROTENÓIDE-*cis-trans*-ISOMERASE (CRTISO) que converte o tetra-*cis*-licopeno em *trans*-licopeno (ISAACSON et al., 2002).

O alelo dominante *Beta* (*B*) é uma mutação ganho de função da enzima LICOPENO- β -CICLASE. Nos frutos onde este alelo está presente ocorre a conversão de quase todo o licopeno em β -caroteno, resultando em frutos de coloração laranja. Existem ao menos três alelos para o gene que codifica a enzima LICOPENO- β -CICLASE. O alelo recessivo *b* é a condição encontrada na maioria das cultivares, inclusive no MT, onde ocorre acúmulo normal de licopeno nos frutos. O terceiro alelo *old gold* (*og*) carrega uma mutação de perda de função da enzima LICOPENO- β -CICLASE, o que acarreta um aumento no conteúdo de licopeno (ZHANG; STOMMEL JR, 2000).

O mutante *Delta carotene* carrega o alelo dominante *Del* que converte o licopeno em δ -caroteno, devido ao aumento na transcrição da enzima LICOPENO- ϵ -CICLASE. O resultado são plantas apresentando frutos de coloração vermelho-alaranjada (RONEN et al., 1999).

Diferentemente das mutações descritas acima, as quais afetam enzimas ligadas a biossíntese de carotenóides, o alelo *y* presente no mutante *colorless fruit epidermis* afeta o fator de transcrição SIMYB12, causando um decréscimo no conteúdo de flavonoides na epiderme dos frutos, os quais adquirem uma coloração rósea, com aspecto semitransparente (ADATO et al., 2009).



Figura 1. Via biossintética de carotenóides. Em azul, as enzimas participantes do ciclo e em verde, as mutações nas atividades enzimáticas das NILs utilizadas neste trabalho. Adaptado de Bordignon (2015).

Ao acompanhar o desenvolvimento da doença nas lesões infectadas com *B. cinerea* é possível observar visualmente que os sintomas da doença evoluíram de forma diferenciada entre os mutantes analisados. Os frutos cujas lesões

coalesceram, em decorrência do avanço da doença, impossibilitaram a continuidade das medições, e assim foram descartados (Figura 2). Os frutos do mutante *colorless fruit epidermis* apresentaram grande crescimento micelial do fungo e amolecimento do tecido com a evolução da doença, sendo a linhagem com maior número de frutos descartados ao final do último dia de avaliação. Como já mencionado, a principal característica desta linhagem é o baixo acúmulo de flavonoides na casca dos frutos. Considerando que há reduzido conteúdo de narigenina chalcona na cutícula destes frutos (*y*), podemos inferir que sua ausência, ou redução torne o fruto mais suscetível ao *Botrytis*.

Nos mutantes *yellow flesh*, *Beta carotene* e *tangerine* o crescimento micelial do fungo não se mostrou muito aparente, entretanto os frutos exibiram discreto escurecimento e acentuado amolecimento dos tecidos ao redor das lesões, que evoluiu durante os dias de avaliação. Por outro lado, os frutos do mutante *Delta carotene* se mostraram menos suscetíveis, de forma que seu tecido não foi inteiramente danificado pela doença e o crescimento micelial do fungo não se mostrou muito evidente (Figura 3).

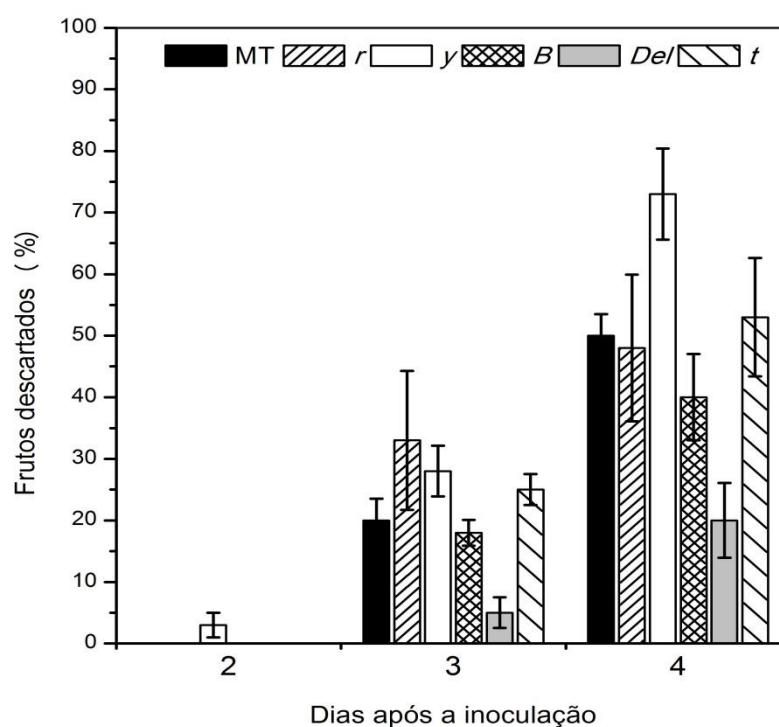


Figura 2. Quantidade de frutos descartados durante os dias de avaliação. Barras verticais indicam o erro padrão (n=6).

Outros pigmentos flavonoides, como as antocianinas, são conhecidos por sua participação na defesa vegetal. Recentemente ZHANG et al., (2013) relataram que tomates enriquecidos com antocianinas são menos suscetíveis ao *B. cinerea* e isso se deve ao retardo no *burst* oxidativo desencadeado pelo fungo durante a infecção. Sendo assim, o caráter antioxidante do pigmento predominante no tecido parece ser importante no que se refere a resposta de defesa esperada.

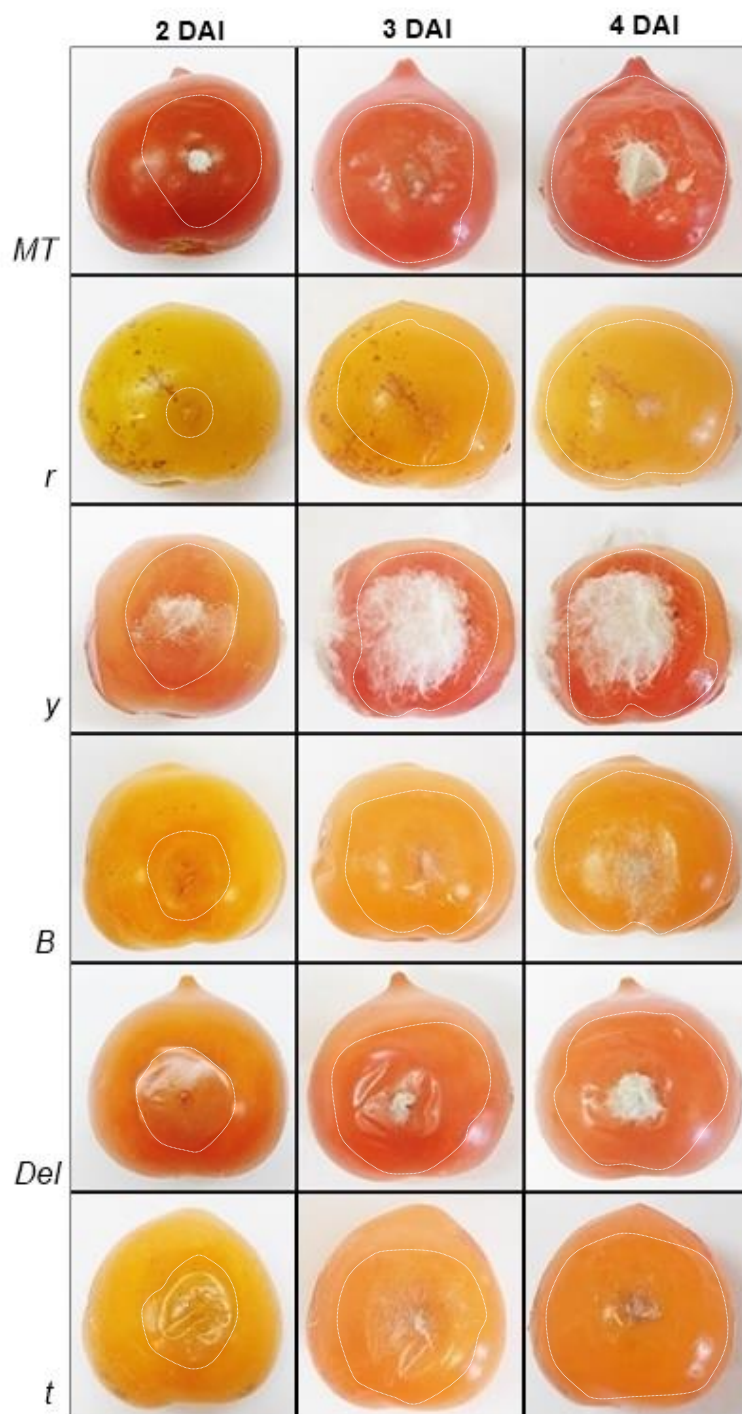


Figura 3. Suscetibilidade de genótipos de tomateiro ao fungo *B. cinerea*. Caracterização visual dos sintomas em lesões em 2, 3 e 4 dias após a inoculação (DAI) com *B. cinerea*.

O modo de colonização dos tecidos pelo fungo *Botrytis cinerea* é caracterizado pela síntese de toxinas que induzem a clorose e necrose dos tecidos, além da produção de espécies reativas de oxigênio causadoras de danos aos componentes celulares (CHOQUER et al., 2007). Os carotenóides, além de suas conhecidas funções na fotossíntese, coloração e aroma de frutos e benefícios nutricionais, também estão associados à atividade antioxidante, sendo considerados a linha de frente na defesa vegetal contra EROs produzidas nas reações fotossintéticas (KRINSKY, 1979; RAMEL et al., 2012). O licopeno – carotenóide encontrado em grandes quantidades no fruto do tomateiro – é relatado ser um importante antioxidante em diversos trabalhos, em razão de sua capacidade de combater a geração de espécies reativas de oxigênio (BOHM et al., 2002; HANSON et al., 2004). Os antioxidantes encontrados nos frutos podem proteger os tecidos contra variados estresses e doenças. Alguns pigmentos com atividade antioxidante são amplamente estudados por sua capacidade de proteger os frutos contra a ação de patógenos, como no caso de antocianinas (ZHANG et al., 2013). Entretanto, o papel desempenhado pelos carotenóides na defesa do fruto do tomateiro contra fungos necrotróficos ainda é desconhecido.

O desenvolvimento diferenciado dos sintomas entre os genótipos pode estar relacionado com o tipo de carotenóide acumulado nos frutos, considerando que a estrutura dessas moléculas exerce influência em suas propriedades antioxidantes (STAHL e SIES, 2003; HANDELMAN, 1996) e possivelmente em sua suscetibilidade a patógenos. Um exemplo é a atividade antioxidante do licopeno que é influenciada por sua forma isomérica. Estudos comparando a eficiência do licopeno e seus isômeros demonstram que este carotenóide apresenta maior atividade antioxidante quando encontrado na configuração *cis* (MULLER et al., 2011). O mutante *tangerine*, utilizado neste trabalho, apresenta acúmulo de licopeno na forma *cis*, consequência da perda de função da enzima *carotenóide-cis-trans-isomerase* (CRTISO), responsável pela conversão do licopeno da forma *cis* (prolicopeno) para a forma *trans*, resultando no acúmulo de prolificopeno (Figura 1). Como já relatado, visualmente, os sinais do crescimento do fungo não se mostraram muito evidentes neste mutante, entretanto os tecidos apresentaram acentuado amolecimento no local das lesões. Este fato possivelmente favoreceu a baixa resistência do tecido ao fungo considerando os parâmetros de suscetibilidade avaliados (Figura 4).

O mutante *Delta carotene*, cujos frutos exibem maior acúmulo do carotenóide δ -caroteno, foi o único que revelou menor suscetibilidade ao fungo *B. cinerea* segundo os parâmetros de suscetibilidade. Frutos deste genótipo apresentaram os menores valores de incidência e severidade no primeiro dia de avaliação, bem como um menor valor de diâmetro das lesões, no primeiro e segundo dia de avaliação (Figura 4). Apesar da falta de dados relacionando o acúmulo deste carotenóide com o aumento da resistência a patógenos, bem como de sua atividade antioxidante, Ronen et al (1999) relata que o mutante *Delta carotene* também exibe maior conteúdo de α -caroteno e luteína, justamente por utilizarem o δ -caroteno como substrato para a sua produção (Figura 1). O α -caroteno é o terceiro pigmento com maior atividade antioxidante, logo atrás do licopeno e do α -tocoferol (vitamina E). Em ordem decrescente, os pigmentos com maior atividade antioxidante são licopeno, α -tocoferol, α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, β -caroteno e luteína (HEBER e LU, 2002).

Mesmo que visualmente alguns dos genótipos tenham apresentado menor suscetibilidade ao fungo, apenas o mutante *Delta carotene* diferiu estatisticamente mostrando maior resistência ao patógeno quando comparado ao MT e aos demais mutantes. A cultivar Micro Tom apresenta resistência contra uma espécie selvagem de *Fusarium* e carrega ao menos dois genes independentes que conferem resistência ao patógeno *Cladosporium fulvum* (MARTI et al., 2006). Em seu estudo, Takashi et al (2004) avaliando a suscetibilidade do MT a vários patógenos verificou que esta cultivar se mostrou suscetível a alguns patógenos de importância econômica que acometem o tomateiro, inclusive ao estágio telemórfico do *Botrytis*: a espécie *Botryotinia fuckeliana*. Contudo para as espécies em que o MT se mostrou resistente os autores constataram a ocorrência do mecanismo de resposta de hipersensibilidade. Este tipo de resistência é caracterizado por ocasionar necroses através da produção de EROs, levando à morte o tecido atacado e impedindo a continuidade do desenvolvimento do patógeno (REZENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Contudo, este mecanismo se mostrou eficaz no experimento em questão por se tratarem de fungos biotróficos, ou seja, que utilizam células vivas para a colonização do tecido. O fungo *B. cinerea*, por outro lado, é classificado como necrotrófico, e um de seus mecanismos de ataque utiliza justamente a maquinaria das plantas que, por meio da resposta de hipersensibilidade, induzem a produção de EROs levando o tecido a morte e permitindo sua colonização (ROSSI et al., 2011).

No trabalho realizado por Zhang et al (2013) os frutos de tomateiro que apresentavam acúmulo de específicos flavonoides foram menos suscetíveis ao *Botrytis* por alterarem a dinâmica da produção de EROs, consequentemente limitando a morte dos tecidos ao redor da área lesionada.

Embora a resposta de hipersensibilidade possa ser uma resposta para a suscetibilidade das plantas, não explica o efeito observado neste trabalho. Deve-se considerar que todas as linhagens foram colhidas em avançado estágio de maturação, consequentemente não é possível excluir o efeito etileno em tornar os frutos mais propensos às infecções. Com o amadurecimento alguns eventos fisiológicos são dependentes da sinalização do etileno, a exemplo da síntese de determinados carotenóides. Contudo, a degradação da parede e da lamela média contribui em maior extensão para que os tecidos tornem-se mais suscetíveis a patógenos necrotróficos (ZUO et al., 2012). De modo geral, à medida que o amadurecimento do fruto se intensifica há maior propensão ao ataque por fungos, de modo a garantir a liberação das sementes caso o fruto não seja consumido pelos animais. Com base no exposto acima acredita-se que o estágio de maturação dos frutos no momento da inoculação pode ter influenciado os resultados obtidos neste estudo, uma vez que os frutos já se encontravam em estágio de maturação avançado.

Cantu et al (2009), estudando a suscetibilidade dos mutantes em etileno, *ripening inhibitor*, *Never ripe* e *non ripening*, ao fungo *B. cinerea* verificou que o patógeno é capaz de induzir respostas associadas ao amadurecimento dos frutos e que os sintomas são mais severos em estádios avançados. Neste mesmo trabalho o desenvolvimento da doença foi avaliado em dois estádios de maturação dos frutos levando em consideração a incidência e o diâmetro das lesões, e os valores do tratamento controle no estágio *red ripe* foram semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Entretanto, no trabalho citado acima o crescimento micelial do fungo *B. cinerea* se expandiu por todo o pericarpo dos frutos quando estes se encontravam no estágio *red ripe*, diferentemente do observado neste experimento para os mutantes *tangerine*, *yellow flesh* e *Beta carotene* que não favoreceram o crescimento micelial do fungo mesmo em avançado estágio de maturação. Esse fato sugere que o acúmulo diferencial destes carotenóides na polpa pode retardar o processo de colonização do tecido pelo patógeno (Figura 3).

Mesmo com o avançado estágio de maturação dos frutos é importante ressaltar que o mutante *Delta carotene* se mostrou capaz de retardar o desenvolvimento dos sintomas causados pelo fungo *B. cinerea* (Figura 3 e 4), o que pode indicar um papel diferenciado do carotenóide δ -caroteno na resistência a este patógeno. Por esta razão, novos experimentos comparando a suscetibilidade destes genótipos em diferentes estádios de maturação são necessários, uma vez que o processo de amadurecimento, desencadeado pelo etileno, torna o tecido mais suscetível às podridões (CANTU et al., 2009). Além disso, a determinação da capacidade antioxidante de cada um dos carotenóides estudados poderia indicar se o efeito observado contra o fungo envolve o mecanismo de remoção de espécies reativas de oxigênio.

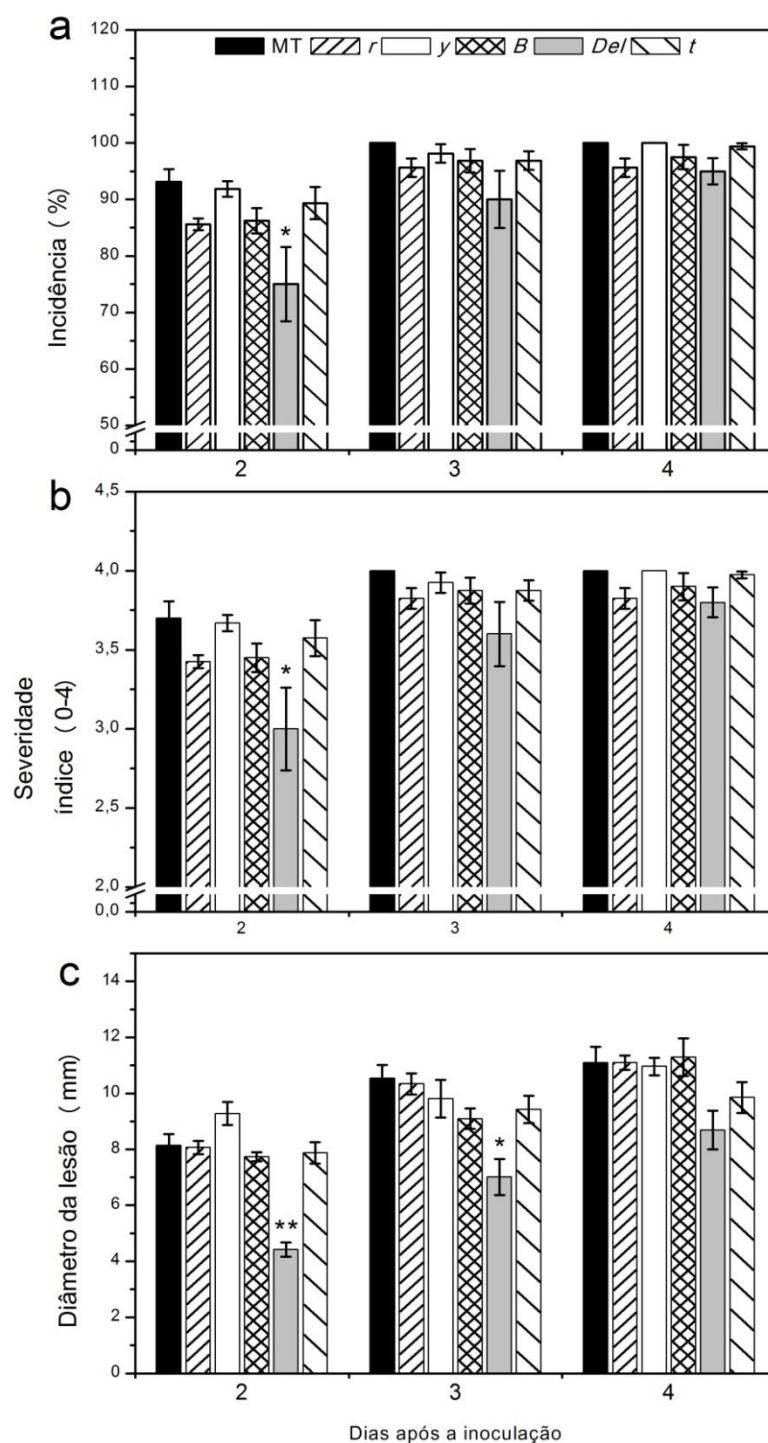


Figura 5. Suscetibilidade de NIL de tomateiro ao fungo *B. cinerea* após quatro dias de inoculação. (A) Incidência da doença (B) Severidade da doença. Índice de severidade (número de lesões com sintoma): 0= nenhuma lesão; 1= uma lesão; 2= duas lesões; 3= três lesões e 4= quatro lesões. (C) Evolução do diâmetro das lesões. Barras verticais indicam o erro padrão (n=6). (*) Diferença significativa entre os genótipos dada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A resistência dos frutos contra doenças é um dos fatores que mais influenciam a perda de qualidade no período pós-colheita. Outros fatores envolvem o teor de açúcares, acidez, textura e sabor, afetando diretamente a aceitabilidade pelos consumidores, bem como a qualidade nutricional dos frutos (FERREIRA, et al., 2009). Comparando parâmetros de qualidade dos mutantes *Beta carotene*, *tangerine*, *yellow flesh*, *colorless fruit epidermis* e *Delta carotene* com a cultivar Micro Tom, Bordignon (2015), verificou que a qualidade nutricional do tomate é influenciada pelo tipo de carotenóide acumulado na polpa e que a coloração dos frutos não é necessariamente indicativa de qualidade nutricional.

Neste trabalho verificou-se que o tipo de carotenóide acumulado na polpa e/ou epiderme pode alterar a suscetibilidade do tomate ao patógeno *B. cinerea*, mesmo em avançado estágio de maturação. Considerando este fato, seria importante determinar em estudos futuros se a suscetibilidade destes genótipos é influenciada pelo estágio de desenvolvimento do fruto. Adicionalmente uma caracterização mais detalhada destes quanto a parâmetros associados ao estresse oxidativo seria interessante de modo a determinar se a suscetibilidade do fruto ao referido fungo envolve mecanismos de remoção de radicais livres mediados pelos carotenóides.

4 CONCLUSÕES

O acúmulo do carotenóide δ -caroteno na polpa diminui a suscetibilidade dos frutos ao fungo *B. cinerea*.

O acentuado amolecimento e escurecimento dos tecidos das lesões, nos genótipos *tangerine*, *yellow flesh* e *Beta carotene*, contribuiu para o aumento da suscetibilidade, entretanto constatou-se que visualmente o crescimento micelial do fungo foi suprimido nestes genótipos.

O avançado estágio de maturação dos frutos no momento da inoculação contribuiu para o aumento da suscetibilidade ao fungo em todos os genótipos.

O uso das NILs constitui um elegante modelo para o estudo do papel dos carotenóides na suscetibilidade dos frutos do tomateiro ao fungo *B. cinerea*.

Near-isogenic lines as a toolkit to study the involvement of carotenoids in the susceptibility of tomato fruit to *B. cinerea*

Bruna Orsi

Abstract

Botrytis cinerea is responsible for considerable losses in the postharvest of many fruit species. To evaluate the contribution of carotenoids in the susceptibility of fruits to rots caused by this fungus, five near isogenic lines to the cultivar Micro Tom were used, differing only on the predominant type of carotenoid accumulated in the fruit, e.g: *tangerine*, *Delta carotene*, *Beta carotene*, *yellow flesh* and *colorless fruit epidermis*. Fruits of each genotype were injured and inoculated with *Botrytis cinerea* (10^5 spore mL⁻¹) and the susceptibility was represented as incidence, severity and lesion diameter. The results indicated high susceptibility of most genotypes except to *Delta carotene* mutant, which show less susceptibility even at advanced ripening stage. On the other hand, *colorless fruit epidermis* was more prone to *Botrytis*, probably due to the lack of flavonoids in the fruit epidermis. The marked softening and darkening of tissue lesions observed in *tangerine*, *yellow flesh* and *Beta carotene*, contributed to increased susceptibility, nevertheless in these genotypes visually the micelial growth was suppressed. The ripening stage of fruit at inoculation likely contributed to increase susceptibility of all genotypes; so, further studies must be done to elucidate the real contribution of carotenoids in the fruit susceptibility to gray mold.

Keywords: Micro- Tom. Carotenoids. Gray mold.

REFERÊNCIAS

- ADATO, A.; MANDEL, T.; MINTZ-ORON, S.; VENGER, I.; LEVY, D.; YATIV, M.; DOMÍNGUEZ, E.; WANG, Z.; VOS, R. C. H.; JETTER, R.; SCHREIBER, L.; HEREDIA, A.; ROGACHEV, I.; AHARONI, A. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network. **Plos Genetic**, v. 5, n. 12, 2009.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; ALENCAR, A. A.; NUNES, X. P.; TOMAZ, A. C. A.; SENA-FILHO, J. G.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; da-CUNHA, E. V. L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 135-154, 2008.
- BOHM, V.; PUSPITASARI-NIENABER, N. L.; FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S. J. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrical Isomers of α -Carotene, β -Carotene, Lycopene, and Zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 221-226, 2002.
- BORDGNON, S. R. **Obtenção e uso de linhagens quase-isogênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Cv Micro Tom) afetando a composição de carotenóides**: uma ferramenta para o estudo da nutraceutica. 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas e dados básicos de economia**. Brasília: Secretaria de Política Agrícola, 2015.
- CAMPOS, M. L.; CARVALHO, F. C.; BENEDITO, V. A.; PERES, L. E. P. The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling and Behavior**, v. 5, n. 3, p. 267-270, 2010.
- CANTU, D.; BLANCO-ULATE, B.; YANG, L.; LABAVITCH, J. M.; BENNETT, A. B.; POWELL, L. T. Ripening-Regulated Susceptibility of Tomato Fruit to *Botrytis cinerea* Requires NOR But Not RIN or Ethylene. **Plant Physiology**, v. 150, p.1434-1449, 2009.
- CARVALHO, R. F.; CAMPOS, M. L.; PINO, L. E.; CRESTANA, S. L.; ZSOGON, A.; LIMA, J. P.; BENEDITO, V. A.; PERES, L. E. P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, v. 7, n. 18, p. 1-14, 2011.
- CAZZONELLI, Christopher. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. **Functional Plant Biology**, vol. 38, pág. 833–847, 2011.
- CHENG, X.; ZHANG, D.; CHENG, Z.; KELLER, B.; LING, H. Q. A new family of Ty1-copia-Like retrotransposons originated in the tomato genome by a recent horizontal transfer event. **Genetics**, v. 181, p. 1183–1193, 2009.

CHOQUER, M.; FOURNIER, E.; KUNZ, C.; LEVIS, C.; PRADIER, J. M.; SIMON, A.; VIAUD, M. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **FEMS Microbiology letters**, v. 277, n.1, p. 1-10, 2007.

DROBY, S.; LICHTER, A. Post-harvest botrytis infection: etiology, development and management. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZINSKI, P.; DELEN, N. (Eds). *Botrytis: biology, pathology and control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 349-367, 2004.

FERREIRA, R.; SOUZA, P. A.; CARVALHO, J. N.; SILVAL, F. L.; SILVA, M. Fatores de pré e pós-colheita que afetam os frutos e hortaliças em pós-colheita. **Revista verde**, v. 4, n. 3, p. 13-21, 2009.

GIOVANNONI, J. J. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **American Society of Plant Biologists**, v. 16, n. 1, p. 170-180, 2004.

HANDELMAN G. J. Carotenoids as scavengers of active oxygen species. In: **Handbook of antioxidants**, CADENAS, E.; PACKER, L. (Eds). New York: Marcel Dekker, p. 259-314, 1996.

HANSON, P. M.; YANG, R. WU, J.; CHEN, J.; LEDESMA, D.; TSOU, S. C. S. Variation for antioxidante activity and antioxidants in tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 5, n. 129, p. 704-711, 2004.

HEBER, D. ; BOWERMAN, S. Applying science to changing dietary patterns. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 11, 2001.

HEBER, D.; LU, Q. Y. Overview of mechanisms of action of lycopene. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 10, p. 920-923, 2002.

ISAACSON, T., RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene na xanthophylls in plants. **Plant Cell** v. 14, p. 333–342, 2002.

JEZ, J. M.; NOEL, J. P. A. Kaleidoscope of carotenoids. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 825-826, 2000.

KRINSKY, N. I. Carotenoid protection against oxidation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 51, p. 649-660, 1979.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G. J.; DIXON, M. S.; GARCIA-MARTINEZ, J. L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro Tom. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2037-2047, 2006.

MEISSNER R.; JACOBSON Y.; MELAMED S.; LEVYATUV S.; SHALEV G.; ASHRI A.; ELKIND Y.; LEVY A. A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, v. 12, p. 1465–1472, 1997.

MOISE, A. R.; AL-BABILI, S.; WURTZEL, E. T. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. **Chemycal Reviews**, v. 114, n. 1, p. 164-193, 2013.

MÜLLER, L.; GOUPY, P.; FRÖHLICH, K.; DANGLES, O.; CARIS-VEYRAT, C.; BÖHM, V. Comparative study on antioxidant activity of lycopene (Z)-isomers in different assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4504-4511, 2011.

RAMEL, F.; BIRTIC, S.; GINIES, C.; SOUBIGOU-TACONNAT, L.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; HAVAUX, M. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 109, n. 14, p. 5535-5540, 2012.

REZENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de Carotenóides**: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 98p.

RONEN, G.; COHEN M.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *delta*. **Plant Journal**, v. 17, p. 341-351, 1999.

ROSSI, F. R.; GARRIZ, A.; MARINA, M.; ROMERO, F. M.; GONZALES, M. E.; COLLADO, I. S.; PIECKSTAIN, F. L. The Sesquiterpene Botrydial Produced by *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response on Plant Tissues and Its Action Is Modulated by Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling. **The American Phytopathological Society**, v. 24, n. 8, p. 888–896, 2011.

RUIZ-SOLA, A.; RODRIGUES-CONCEPCIÓN, M. **Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway**. The Arabidopsis Book, v.10, 2012. 28p.

SESTARI, I.; ZSÖGÖN, A.; REHDER, G. G. ; TEIXEIRA, L. L.; HASSIMOTTO, N. M. A. ; PURGATTO, E.; BENEDITO, V. A. ; PERES, L. E. P. Near-isogenic lines enhancing ascorbic acid, anthocyanin and carotenoid content in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) as a tool to produce nutrient-rich fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 111-120, 2014.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 24, n. 6, p. 345-351, 2003.

SUN, T.; XU, Z.; WU, C. T.; JANES, M.; PRINYAWIWATKUL, W.; NO, H. K. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. 98-102, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKASHI, H.; SHIMIZU, A.; ROSMALAWATI, T. A. S.; FUKUSHIMA, S.; KIKUCHI, M.; HIKICHI, Y.; KANDA, A.; TAKAHASHI, A.; KIBA, A.; OHNISHI, K.; ICHINOSE, K.;

TAGUCHI, F.; YASUDA, C.; EGUSA, M. K. M; MASUTA, C.; SAWADA, H.; SHIBATA, D.; HORI, K.; WATANABE, Y. Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. **Journal of Genetic Plant Pathology**, v. 71, p. 8–22, 2005.

WELLS, H. J. **Vegetables and pulses**: Tomatoes. United States Department of Agriculture. 2016. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/topics/crops/vegetables-pulses/tomatoes.aspx>> Acesso em: 15/04/2015.

ZHAO, Y.; TU, K.; SHAO, X. F.; JING, W.; YANG, J. L.; SU, Z. P. Biological control of the post-harvest pathogens *Alternaria solani*, *Rhizopus stolonifer*, and *Botrytis cinerea* on tomato fruit by *Pichia guilliermondii*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 132-136, 2008.

ZHANG, Y.; STOMMEL, J. R. RAPD and AFLP tagging and mapping of Beta (B) and Beta modifier (MoB), two genes wich influence b-carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 368-375, 2000.

ZHANG, Y.; BUTELLI, E.; STEFANO, R.; SCHOONBEEK, H.; MAGUSIN, A.; PAGLIARANI, C.; WELLNER, N.; HILL, L.; ORZAEZ, D.; GRANELL, A.; JONES, J. D. G.; MARTIN, C. Anthocyanins Double the Shelf Life of Tomatoes by Delaying Overripening and Reducing Susceptibility to Gray Mold. **Current Biology**, v. 23, n. 12, p. 1094-1100, 2013.

ZUO, J.; ZHU, B.; FU, D.; ZHU, Y.; MA, Y.; CHI, L.; JU, Z.; WANG, Y.; ZHAI, B.; LUO, Y. Sculpting the maturation, softening and ethylene pathway: The influences of microRNAs on tomato fruits. **BMC Genomics**, vol. 13, n.7, 2012. 12p.